

Aus der Chirurgischen Klinik mit Poliklinik
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. med. G. Hegemann

Untersuchungen über die Wirkung
von KALLIKREIN auf die
Bindegewebsproliferation innerer Organe
und das Haarwachstum im Tierversuch

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Friedrich Lothar Kern
aus Wiedersbach/Mfr.

Aus der Chirurgischen Klinik mit Poliklinik
der Universität Erlangen - Nürnberg

Direktor: Professor Dr. med. G. Hegemann

Untersuchungen über die Wirkung
von KALLIKREIN auf die
Bindegewebsproliferation innerer Organe
und das Haarwachstum im Tierversuch



Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Friedrich Lothar Kern
aus Wiedersbach/Mfr.

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer

Referent: Prof. Dr. J. Geldmacher

Korreferent: Prof. Dr. G. Hegemann

Tag der mündlichen Prüfung: 27. September 1976

Inhaltsverzeichnis

A Allgemeiner Teil

I Das KALLIKREIN-Kinin-System

1. Zur Geschichte der KALLIKREIN-Forschung
2. Chemie der Kinine
3. Freisetzung und Aktivierung von Kininen
4. Isolierung von KALLIKREIN aus organischen Substraten
5. Aktivitätsbestimmung von KALLIKREIN
6. Funktion und Wirkungsweise von KALLIKREIN im Organismus
 - a) Vasodilatation und Blutdruckabfall
 - b) Schutz- und Warnsystem
 - c) Wirkung auf die Zellproliferation
 - d) Wirkung auf die Darmmotilität
 - e) Resorption verschiedener Substanzen aus dem Darm
 - f) Nierenfunktion

II Wirkung von KALLIKREIN auf Mitoserate und Zellproliferation

III Wirkung von KALLIKREIN auf die Bindegewebsproliferation

IV Mögliche Mechanismen einer pathologischen Wirksamkeit von KALLIKREIN

B Spezieller Teil

I Versuchsgrundlage

II Material

1. KALLIKREIN

2. Versuchstiere

3. Tierhaltung

III Durchführung

1. Versuchsablauf und Gruppeneinteilung

2. Applikationsformen

a) Orale Applikation

b) Lokale Applikation

c) Parenterale Applikation

3. Vorbereitung zur Untersuchung des
Haarwachstums

4. Haarwachstumskontrollen

5. Versuchsende und Gewebsentnahmen

6. Histologische Technik

IV Ergebnisse

1. Haarwachstum

2. Innere Organe

a) Sektionsbefunde

b) Histologie

V Diskussion

1. Haarwachstum

2. Organbefunde

Einleitung

Seit E.K.FREY et al. 1928 im Tierversuch eine blutdrucksenkende Substanz im Urin entdeckte, welche später als das Plasmakinin KALLIKREIN erkannt wurde, laufen in zahlreichen Laboratorien Versuche zur Erforschung von Chemie und Physiologie dieses Stoffes. In den letzten Jahren wurde dabei auch ein mitosefördernder Effekt und neuerdings eine besondere, stimulierende Wirkung auf die Bindegewebsproliferation bekannt. Da die Anregung der Bindegewebsneubildung in vielen Bereichen der Chirurgie besonders erwünscht wäre, ist dieser Eigenschaft von Kallikrein besondere Aufmerksamkeit zu schenken. Dabei ist jedoch zu bedenken, daß zahlreiche Erkrankungen auf einer pathologischen Vermehrung des mesenchymalen Anteils in den betroffenen Organen beruhen.

Unsere Untersuchungen waren deshalb der Frage gewidmet, ob KALLIKREIN einen auslösenden oder stimulierenden Effekt auf pathologische Bindegewebsvermehrungen ausübt.

Ein zweiter Teil unserer Arbeit beschäftigte sich mit einer besonderen Form der Zellproliferation, dem Haarwachstum.

A Allgemeiner Teil

I. Das KALLIKREIN - Kinin-System

1. Zur Geschichte der KALLIKREIN -Forschung

Im Jahre 1925 stellte E.K.FREY et al. auf der Suche nach der Ursache der sogenannten reflektorischen postoperativen Anurie fest, daß Urin, Hunden injiziert, bei diesen einen starken Blutdruckabfall hervorruft. Die Annahme, daß es sich um eine bisher nicht beachtete Wirkung des bereits bekannten Histamins handle, wurde durch die Tatsache widerlegt, daß die Substanz durch Erhitzen zerstört wurde, bei der Dialyse aber nicht durch die Membran permeierte. Dieses Verhalten schloß die niedermolekulare Substanz Histamin aus und machte ein hochmolekulares Protein wahrscheinlich, welches nach FREY F-Substanz genannt wurde.

Bei weiteren Versuchen erkannten FREY und KRAUT (1928) sowie KRAUT et al. (1928), daß F-Substanz durch den Kontakt mit Blut inaktiviert wurde. Diese und andere Beobachtungen legten die Vermutung nahe, daß es sich hier um ein Hormon handle.

Auf der Suche nach der Produktionsstätte stieß KRAUT et al. (1930) zunächst auf das Pancreas, mit dessen griechischem Terminus es nun als KALLIKREIN bezeichnet wurde.

WERLE und RODEN (1936) fanden KALLIKREIN aber auch in den Speicheldrüsen und DeCARVALHO (1971) in der Niere. Weitere Forscher isolierten es aus den Samen-
drüsen, dem Akrosom menschlicher Spermatozyten und aus dem Blutserum. KRAUT et al. (1933) und WERLE (1936) fanden aber auch KALLIKREIN -Vorstufen, die sich durch Aceton oder Ammoniumsulfat aktivieren lassen. Dabei stellte WERLE (1936) aber fest, daß sich Plasma-
KALLIKREIN in etlichen Eigenschaften von den Organ-
KALLIKREINEN unterscheidet.

2. Chemie der Kinine

KALLIKREIN ist nach WITTE et al. (1962) und BUDDKE (1971) eine Endopeptidase mit vergleichsweise hoher Substratspezifität für ein Plasmaglobulin der α_2 -Fraktion, genannt Kallidinogen, aus dem es durch Spaltung einer Peptidbindung das vasoaktive Kallidin freisetzt.

Die Tatsache, daß KALLIKREIN in seinem Verhalten gegenüber bestimmten Substraten dem bereits gut erforschten Trypsin sehr ähnlich ist, läßt den Schluß auf eine verwandte Struktur zu. Es handelt sich nach FIEDLER et al. (1972) bei KALLIKREIN um ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 24000 für den konstanten Proteinanteil (Trypsin 23800). Das aktive Zentrum hat wie bei Trypsin die Aminosäuresequenz:

Asp - Ser - Gly

weshalb KALLIKREIN nach FIEDLER et al. (1971) zu den Serin -Enzymen zählt.

Bei der Strukturanalyse fand HABERMANN (1962) zwei Formen von KALLIKREIN, die sich jedoch nur in Zahl und Art der enthaltenen Zucker unterscheiden. Es finden sich dabei nach WERLE et al. (1972) die Kohlenhydrate Fucose, Mannose, Glucose und Glucosamin sowie Sialinsäure.

Als hochmolekulares Proteid löst sich KALLIKREIN nur in Wasser oder anderen Lösungsmitteln mit hoher Dielektrizitätskonstante.

Den wesentlichen Unterschied zwischen KALLIKREIN und Trypsin stellt nach ERDÖS (1970) die strenge Substratspezifität des ersteren dar, das nur die Arg - Ser -Bindung am C -terminalen Ende von Kallidinogen und drei weiteren Peptiden mit einer dem C -terminalen Ende von Kallidinogen entsprechenden Sequenz spalten kann.

Wie FREY et al. (1968) zeigte setzt Organ-KALLIKREIN aus Kallidinogen das Dekapeptid Kallidin frei, während die Einwirkung von Serum- KALLIKREIN auf das gleiche Substrat zu einem verwandten Nonapeptid, dem Bradykinin führt. Bei der Aufarbeitung von angesäuertem Plasma fand dieser Autor auch noch ein drittes Kinin, bestehend aus elf Aminosäuren, das Methionyl-Kallidin oder Methionyl-Lysyl-Bradykinin.

Bradykinin	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg
Kallidin	Lys- Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg
Methionyl- kallidin	Met-Lys- Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg

Diese drei Kinine ähneln sich nicht nur stark in der Aminosäuresequenz, sondern auch in der physiologischen

Aktivität. Wie ROCHIA e SILVA (1972) zeigte, nimmt die permeabilitätssteigernde Wirkung umso mehr zu und die blutdrucksenkende Aktivität umso mehr ab, je weiter die Peptidkette am N-terminalen Ende fortgesetzt wird.

3. Freisetzung und Aktivierung von Kininen

Während freie Kinine in Insektengiften in hoher Konzentration enthalten sind und sie sich bei einigen Froscharten in erstaunlichen Mengen unter der Haut finden, sie dienen diesen Tieren wohl als Kampf- und Abwehrstoffe, kommen sie bei den Säugetieren nur in ihren Vorstufen als Kininogene in Plasma und interstitieller Flüssigkeit vor. Sie werden durch KALLIKREIN aus einer längeren Peptidkette durch Hydrolyse abgespalten.

BHoola und DOREY (1971) fanden KALLIKREIN in den Speicheldrüsen in inaktiver Form in Zellorganellen gespeichert. Aus diesen wird es wie BEILENSEN 1968 zeigte, durch Nervenreize freigesetzt. Dagegen liegt es nach BHoola (1969) im Pancreas als inaktives Prä-KALLIKREIN zusammen mit anderen Präenzymen (z.B. Prätrypsin) in spezifischen Granula vor, welche auf Vagusreize oder Pancreocystinstimulation hin entleert werden.

Das Prä-KALLIKREIN wird durch Trypsin in die aktive Form übergeführt. Trypsin selbst muß durch Enterokinase aus dem Duodenum aktiviert werden.

MASHFORD und ROBERTS (1972) fanden KALLIKREIN im Blutplasma stets in einer Konzentration von 0,03 bis 0.1 mg/ml.

Dieses Plasma- KALLIKREIN steht nach MARGOLIS (1960) in enger Beziehung zur Blutgerinnung, denn es wird durch den Kontakt von Blut mit benetzbaren Oberflächen aktiviert. Bei diesem Kontakt wird Faktor VIII, der sogenannte Hagemann-Faktor, der als inaktive Vorstufe im Plasma vorhanden ist, freigesetzt. Dieser führt, wie SCHACHTER (1966) zeigte, Prä-KALLIKREIN in KALLIKREIN über, welches wiederum Bradykinin liberiert. Bradykinin, das auch PPS (Pain Producing Substance) genannt wird, ist eine der stärksten, schmerzauslösenden Substanzen des Körpers.

Noch besser als Faktor VIII selbst aktivieren seine Bruchstücke, die durch die Einwirkung von Plasmin entstehen, das Kininsystem.

Die Wirkung der Kinine ist nur von kurzer Dauer, da sie rasch von Enzymen zerstört werden, die sich in Blutplasma, Lymphe und Geweben finden.

Das folgende Schema nach M. SCHACHTER (1966) zeigt die Zusammenhänge von Blutgerinnung, Fibrinolyse und Kininfreisetzung.

4. Isolierung von KALLIKREIN aus organischen Substraten

KALLIKREIN wird heute in größeren Mengen aus Schweinepancreas gewonnen. Die Isolierung und weitere Reinigung basiert nach KUTZBACH et al. (1972) auf der Tatsache, daß KALLIKREIN sehr stabil ist, nicht der Autodigestion anheimfällt und in besonderem Maße auf seinem niedrigen isoelektrischen Punkt, etwa bei pH 4. Man überläßt das Ausgangsmaterial zunächst der Autolyse und bindet dann KALLIKREIN an Schwermetallsalze. Dies geschieht wahrscheinlich über einen im Substanzgemisch entstandenen Schwermetall-Protein-Komplex. Dieser Metallsalzkomplex wird durch Säulenchromatographie isoliert, was durch den niedrigen isoelektrischen Punkt von KALLIKREIN besonders begünstigt wird, da bei einem pH von 5,0 die meisten Begleitenzyme nicht an die stationäre Phase gebunden werden. Die weitere Reinigung erfolgt durch Wiederholung des geschilderten Prozesses. Man erhält Produkte von maximal 1400 KE/mg Glycoprotein mit einer Verunreinigung durch andere Pancreasproteasen unter 1%.

5. Aktivitätsbestimmung von KALLIKREIN

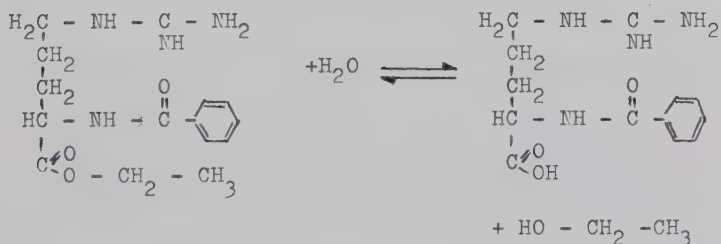
Die ursprüngliche Methode zur Aktivitätsbestimmung von KALLIKREIN bezieht sich auf dessen blutdruck-senkende Wirkung und die Tatsache, daß diese zuerst im Urin entdeckt wurde. Danach lautet die Definition für eine biologische KALLIKREIN -Einheit:

Eine KU entspricht in der Wirkung auf den Blutdruck der Wirkung von 5ml menschlichem Urin aus einer 50 Liter Sammelportion, welche 24 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert wurde (FREY et al. 1950). Aus verständlichen Gründen war diese Methode sehr ungenau.

Es folgte 1962 die erste enzymatische Methode, welche von TRAUTSCHOLD und WERLE angegeben wurde und sich die Tatsache zunutze macht, daß KALLIKREIN als Peptidase in der Lage ist, von der Substanz

α -N-benzoyl-arginin-äthyl-ester = BAEE

Äthylalkohol abzuspalten.



Zunächst wurde bei diesem Vorgang nur im Photometer die Veränderung der Extinction bei 253 nm gemessen. Da diese Bestimmung gegen Verunreinigungen des Ansatzes und Trübungen sehr störanfällig war, suchte man nach einem für die Praxis besser geeigneten Verfahren. ARENS und HABERLAND fanden dies 1972 in der Neutralisation des bei der Reaktion freierwerden Benzoylarginins, welches als Säure reagiert. Man läßt die Reaktion in Gegenwart von Soya-Trypsin-Inhibitor ablaufen, um Artefakte durch Trypsin, welches das Substrat ebenfalls umsetzen kann, zu vermeiden. Nach den Richtlinien der Fédération internationale Pharmaceutique = FIP ist die enzymatische Einheit 1 FIP-U definiert als die Menge von KALLIKREIN, welche unter Standardbedingungen 1 Mol BAEE/Min spaltet. Die geschilderte enzymatische Methode ist etwa zehnmal empfindlicher als der biologische Test. Der Umrechnungsfaktor von enzymatischen Einheiten in biologische Einheiten beträgt nach BHOOJA und DOREY (1971) für Pancreas- KALLIKREIN 6,37. Die Aktivität von 1mg KALLIKREIN -Reinsubstanz entspricht danach 1050 bis 1150 KE. Nach allgemeiner Übereinkunft wird heute die estero-lytische Kapazität von KALLIKREIN in Einheiten entsprechend biologischen Einheiten ausgedrückt. Alle anderen Aktivitäten werden in FIP-U angegeben.

6. Funktion und Wirkungsweise von KALLIKREIN im Organismus

a) Vasodilatation und Blutdruckabfall

Als erste physiologische Eigenschaft von KALLIKREIN wurde seine blutdrucksenkende Wirkung bekannt. Diese beruht auf einer, je nach den Voraussetzungen regionalen oder generalisierten Erweiterung der Gefäße, besonders im Kapillarbereich.

In diesem Zusammenhang ist von Interesse, daß FREY et al. (1968) annimmt, daß KALLIKREIN mit zunehmendem saurem pH des Blutes leichter aktivierbar, oder der Kininabbau herabgesetzt wird. Anlaß zu dieser Annahme sind Beobachtungen bei der in der Chirurgie gebräuchlichen Blutsperre. Nach der Lösung dieser Abbindung kommt es zu einer starken Hyperämie der betreffenden Extremität mit ausgeprägter Rötung und Temperaturanstieg als Zeichen der peripheren Gefäßerweiterung. Offenbar wird im Blut des von der Zufuhr abgeschnittenen Körperteiles mit zunehmender metabolischer Acidose das enthaltene KALLIKREIN aktiviert, welches dann Kallidinogen in das vasoaktive Kallidin transformiert.

Obwohl dieser Mechanismus von verschiedenen Autoren

angezweifelt wird, ist zumindest ein Teil der KALLIKREIN - Sekretion in Speicheldrüsen und Pancreas unter einem ähnlichen Aspekt zu sehen.

HILTON (1966), SCHACHTER (1966) und WERIE (1973) vermuten, daß ein Teil des durch Impulse des vegetativen Nervensystems freigesetzten KALLIKREINS nicht in das Lumen der Acini sezerniert wird, sondern in die interstitiellen Spalten des Drüsengewebes gelangt und zu einer funktionellen Hyperämie des Organs führt.

Die Aufgabe von KALLIKREIN im Körper scheint also unter anderem in einer Weitstellung von Gefäßen zur besseren Versorgung bei gesteigertem Sauerstoffbedarf der Gewebe in der betreffenden Region zu liegen.

b) Schutz und Warnsystem

Während die Organ- KALLIKREINE aus Kininogen Kallidin freisetzen, spaltet Plasma- KALLIKREIN aus dem gleichen Substrat das um eine Aminosäure kürzere Bradykinin ab. Dies zeigten FREY et al. (1968) und ERFÖS (1970).

Da Plasma- KALLIKREIN nach SCHACHTER (1966) einen engen Bezug zum Blutgerinnungssystem hat und Bradykinin eine der am stärksten wirksamen, schmerz- auslösenden Substanzen ist, ist anzunehmen, daß KALLIKREIN auch in den körpereigenen Schutz- und Warnmechanismus einbezogen ist.

c) Wirkung auf die Zellproliferation

Hierauf soll im folgenden Kapitel noch näher eingegangen werden.

d) Wirkung auf die Darmmotilität

Am Dünndarm beobachtete WERLE (1973) eine Steigerung der Motilität unter KALLIKREIN -Einfluß. Hierin ist wohl eine der Aufgaben des aus dem Pancreas in den Darm gelangenden KALLIKREINS zu sehen.

e) Resorption verschiedener Substanzen aus dem Darm

Einen neuen Aspekt in der Frage nach der Funktion des Pancreas- KALLIKREIN bieten die Untersuchungen mehrerer Autoren über den Einfluß auf die Resorption verschiedener Stoffe aus dem Dünndarm.

So zeigten MENG und HABERLAND (1972) eine gesteigerte Aufnahme von Glucose, CASPARY und CREUTZFELDT einen verbesserten Transport von Zuckern und Aminosäuren und DENNHARDT und HABERICH die beschleunigte Resorption von Wasser Elektrolyten und Hexosen unter dem Einfluß von KALLIKREIN. MORIYA und MORIWAKI konnten mit ^{131}J markiertem KALLIKREIN auch eine direkte Permeation dieses Stoffes durch die Darmwand wahrscheinlich machen. Dies ist von besonderem Interesse, da andere Moleküle dieser Größenordnung nicht in der Lage sind, die Mukosabarriere zu durchdringen. Man führt dieses Phänomen auf ein Fehlen von spezifischen Antikörpern gegen KALLIKREIN in der Darmwand zurück.

f) Nierenfunktion

FREY und KRAUT fanden, daß KALIIKREIN zu einem Absinken des Organvolumens der Niere führt. STÜRMER (1962 u. 1963) beobachtete bei Ratten eine antidiuretische Wirkung von KALIIKREIN, welche unabhängig von Blutdruckabfall und Nierendurchblutung ist. Den Beweis dafür erbrachte er durch die Bestimmung der Clearancewerte für PAH und Kreatinin, welche dabei normal blieben. FURUYAMA und SUZUKI (1966) berichteten sogar von einer Steigerung der Kreatininclearance.

Auslösend für die veränderte Nierenfunktion soll nach BISSET und LEWIS (1962) eine ADH-Ausschüttung als Folge des kininbedingten Blutdruckabfalles sein, während ROCHIA e SILVA et al. (1972) eine direkte Stimulation der Hypophyse durch Kinine annehmen.

II Wirkung von KALLIKREIN auf Mitoserate und Zellproliferation

Von besonderem Interesse für unsere Arbeit waren die neueren Erkenntnisse von J.W.ROHEN und I.PETERHOFF sowie von R.H.RIXON und F.WHITFIELD über die Wirkung von KALLIKREIN auf die Mitoserate verschiedener Zelltypen.

ROHEN und PETERHOFF (1972) untersuchten diesen Effekt an den Darmepithelien der Ratte. Dabei wurden KALLIKREIN-Lösungen verschiedener Konzentration sowohl in die freie Bauchhöhle als auch in das Darmlumen injiziert. Zwei, vier, sechs und acht Stunden nach erfolgter Verabreichung wurden die Epithelien mikroskopisch auf ihre Mitoserate untersucht. Es fanden sich bei jungen Tieren wesentlich höhere Zahlen als bei älteren Versuchstieren. Die Reaktionsbereitschaft der Epithelien auf KALLIKREIN nahm vom Duodenum zum Kolon hin ab. Das Maximum des mitogenetischen Effektes zeigte sich vier bis sechs Stunden nach der Injektion.

Die Ligatur des Ductus pancreaticus bei den Versuchstieren führte in den ersten acht Tagen nach dem Eingriff zu einer Senkung der Mitoserate in den Dünndarmepithelien. Diese Repression der Zellaktivität

konnte durch Verabreichung von KALLIKREIN verhindert werden.

Histologisch zeigte sich eine Beschleunigung des Zellkreislaufes im Sinne einer gesteigerten Degeneration und Regeneration.

RIXON und WHITFIELD (1972) beobachteten an Ratten die Wirkung von KALLIKREIN auf Thymus- und Knochenmarkszellen. Sie fanden ebenfalls eine deutliche Erhöhung der Mitoserate mit einem Maximum etwa fünf Stunden nach erfolgter Verabreichung.

In-vitro Versuche dieser Autoren mit KALLIKREIN und Bradykinin an den gleichen Zelltypen zeigten, daß KALLIKREIN nicht direkt, sondern über die freigesetzten Kinine auf die Zellen wirkt. Sie stellten dabei eine Abhängigkeit der Kininwirkung vom Calciumspiegel des Reaktionsmediums mit einem Optimum bei 0,6 mMol fest.

Schließlich sei hier noch G. STÜTTGEN erwähnt, der die Einwirkung von KALLIKREIN auf die Spermienzahl bei Menschen untersuchte. Er beobachtete eine signifikante Steigerung der Zellzahl bei Patienten mit Oligospermie.

III Wirkung von KALLIKREIN auf die Bindegewebs- proliferation

1974 legten LANDSLEITNER, GELDMACHER, FEUSTEL und ITTNER eine Untersuchung über den Einfluß von KALLIKREIN auf die Bindegewebsproliferation vor. Diese Autoren hatten bei Kaninchen Versuche mit dem Desmosom - Modell nach SELYE unternommen, wobei sie Glasröhrchen in das Gewebe zwischen den Schulterblättern der Tiere gelegt und eine lokale oder parenterale Behandlung mit KALLIKREIN beziehungsweise physiologischer Kochsalzlösung angeschlossen hatten. Das Bindegewebswachstum in den Röhrchen wurde nach einer, drei und sechs Wochen makroskopisch und mikroskopisch begutachtet. Sie fanden, daß das lokal gesetzte KALLIKREIN - Depot einen deutlichen Reiz zur Bindegewebsbildung sowie zur anhaltenden Fibrinausscheidung darstellt. Auch scheint nach diesen Untersuchungen KALLIKREIN die Ausreifung des Bindegewebes positiv zu beeinflussen. Bei systemischer Anwendung zeigte sich in diesen Versuchen nicht der gewünschte Erfolg, jedoch konnte auch hier nach sechs Wochen mehr reifes Bindegewebe festgestellt werden als bei den Kontrollen.

IV Mögliche Mechanismen einer pathologischen Wirksamkeit von KALLIKREIN

Über pathologische Veränderungen innerer Organe unter KALLIKREIN -Einfluß liegen bereits einzelne Beobachtungen vor. So zeigte ZWEIFACH 1966 am Rattenmesenterium, daß der Kontakt mit Kininen, in diesem Fall lokal aufgebracht, zu einer Dilatation der Arteriolen und Venolen sowie zur Öffnung weiterer Kapillaren führt. In den Venolen und Sammelvenen kommt es zu einer Permeabilitätssteigerung mit Plasmaverlust und Verklumpung der Erythrocyten was man unter dem Begriff des Sludge zusammenfassen kann.

Am gleichen Versuchsobjekt beobachtete WITTE et al. (1962) den Austritt von Plasmaproteinen aus der Gefäßstrombahn als Folge der gesteigerten Permeabilität bei lokaler KALLIKREIN -Applikation.

STÜRMER zeigte 1966 in den abführenden Lymphstämmen eine Zunahme von Lymphvolumen, Lymphocyten und Proteinen nach intraarterieller KALLIKREIN -Infusion. Er wertete dies ebenfalls als Zeichen einer gesteigerten Membrandurchlässigkeit.

Schließlich bewies ZWEIFACH (1966), daß Kinine auch deutlich pathologische Zustände verursachen können, wenn sich zum Beispiel die Wirkungen von Bradykinin

und Serotonin addieren. In diesem Fall kommt es zu einer geringen Dilatation der Arteriolen, einer Kontraktion der Venolen, zu erhöhter Permeabilität der Gefäße und zur Stase des Blutstromes mit einer Schädigung von Kapillaren und Venolen. Dieser Schaden zeigt sich makroskopisch durch petechiale Blutungen im Venolenbereich und mikroskopisch findet man eine Schwellung der Endothelien. LUDANY et al. (1967) beobachtete, daß Kinine zur Ansammlung von Leukocyten im Sinne einer Chemotaxis führen. Die Leukocyten enthalten Kininasen zum Kininabbau. Ihre Fähigkeit zur Phagocytose, etwa von Bakterien, wird durch die Anwesenheit von Kininen gefördert. Die Kinine stehen also auf der einen Seite in engem Zusammenhang mit Entzündungsprozessen, auf der anderen Seite mit der Blutgerinnung und sind so als wichtiger Faktor in die Wundheilung integriert.

Einen weiteren Beweis für die Beteiligung der Kinine an Entzündungsvorgängen liefert die Wirksamkeit des Proteinaseinhibitors Trasylol^R in der Therapie der Pancreatitis.

Weitere Untersuchungen zeigten, daß KALLIKREIN im Splanchnikusgebiet zu einer Verminderung des Volumens von Leber, Milz und Darm führt. Nach SCHNEIDER und SPRINGORUM (1939) kommt es in der Phase des Blut-

druckabfalls nach KALLIKREIN -Injektion zu einer Entspeicherung der Milz.

Setzt man eine Kombination von Stase im Kapillargebiet, Endothelschädigung und lokaler Leukocytose mit gesteigerter Leukocytenaktivität im Splanchnikusgebiet voraus, so ist eine Schädigung von Leber oder Milz wohl denkbar. Es ist zumindest zu diskutieren, ob KALLIKREIN nicht bei parenteraler Applikation hoher Dosen mit maximaler Konzentration im Pfortaderblut eine Leberschädigung nach dem Muster einer monolobulären Cirrhose auslösen kann. Dies liegt um so näher, als die Untersuchungen von LANDSLEITNER et al. (1974) eine proliferationsfördernde Wirkung von KALLIKREIN auf Fibroblasten annehmen lassen.

B Spezieller Teil

I Versuchsgrundlage

1971 wiesen WHITFIELD und BAYLISS erstmals eine Stimulation der Mitoserate von Thymus- und Knochenmarkszellen durch KALLIKREIN nach. Bereits zehn Jahre vorher hatten MASSART et al. (1961 und 1962) rascheres Abheilen von Radiodermatitis unter KALLIKREIN -Gaben bei Ratten beobachtet.

1974 beantworteten LANDSLEITNER, GELDMACHER, FEUSTEL und ITTNER die Frage, ob KALLIKREIN einen Einfluß auf die Bindegewebsproliferation ausübe, positiv. Ihre Tierversuche mit dem Desmon -Modell nach SELJE zeigten, daß vor allem die lokale Applikation von KALLIKREIN die Ausbildung und Reifung von Bindegewebe sehr günstig beeinflusst. Aber auch bei systemischer Anwendung fand sich mehr reifes Bindegewebe als bei den Kontrollgruppen.

Diese Beobachtungen, vor allem der Einfluß von parenteral verabreichtem KALLIKREIN auf einen lokalen, der Wundheilung nahestehenden Prozess, regten uns zu der Untersuchung an, ob KALLIKREIN zu Veränderungen an inneren Organen, besonders im Sinne einer bindegewebigen Induration führt.

Einen weiteren Ausgangspunkt unserer Arbeit bildete die Beobachtung von LANDSLEITNER, daß bei den mit KALLIKREIN behandelten Tieren das für die Operation rasierte Fellareal rascher wieder behaart war als bei den Kontrollgruppen.

II Material

1. KALLIKREIN

Hochgereinigtes KALLIKREIN in wässriger Lösung
erhielten wir von der Firma BAYER, Leverkusen.

Wir verwendeten Lösungen mit

200 KE/ml	zur oralen Verabreichung
200 KE/ml	zur lokalen Applikation
40 KE/ml	zur intraperitonealen Injektion

Die Lösungen wurden bis zum Verbrauch bei
+4 °C gelagert.

2. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten uns reinrassige,
männliche SPF WISTAR-Ratten mit einem Gewicht
von 200 bis 250 Gramm bei Versuchsbeginn.
Wir bildeten Gruppen zu je zwanzig Tieren.

3. Tierhaltung

Die Tiere wurden in einem Raum mit natürlichem Tageslicht und einer konstanten Temperatur von 22 °C gehalten.

Die Ernährung erfolgte ausschließlich mit Trockenpreßfutter "altromin 1324" der Firma Altrogge/Lage.

Zusammensetzung:

Rohprotein.....	19,0 %
Rohfett.....	4,2 %
Rohfaser.....	6,0 %
Asche.....	7,0 %
Wasser.....	12,5 %

Dazu erhielten die Tiere Wasser ad libidum.

III Durchführung

1. Versuchsablauf und Gruppeneinteilung

Bei allen Tieren wurde zu Versuchsbeginn ein definiertes Fellareal rasiert und im Abstand von jeweils drei Tagen Haare aus diesem Gebiet zur Längenbestimmung entnommen.

Am Ende des Versuchszeitraumes wurden alle Tiere getötet und jeweils Leber, Milz, Niere und ein Hoden zur histologischen Untersuchung entnommen.

Gruppeneinteilung

- Gruppe 1 erhielt täglich 2000 KE/kg oral verabreicht.
- Gruppe 2 erhielt täglich die der Flüssigkeitsmenge der KALLIKREIN -Lösung entsprechende Menge physiologische Kochsalzlösung.
- Gruppe 3 wurde täglich mit 200 KE/kg auf einem definierten Fellareal gepinselt.
- Gruppe 4 wurde mit einer entsprechenden Menge physiologischer Kochsalzlösung gepinselt.
- Gruppe 5 erhielt täglich 200 KE/kg intraperitoneal injiziert.
- Gruppe 6 erhielt täglich das entsprechende Volumen physiologische Kochsalzlösung injiziert.

2. Applikationsformen

a) Orale Applikation

Die Tiere mit oraler Verabreichungsform erhielten die oben genannte Menge KALLIKREIN in einer Portion in 10 ml Trinkwasser. Diese Verabreichungsform mußte gewählt werden, nachdem der Versuch, eine Sonde ohne Narkose einzuführen, gescheitert war.

Wegen der hepatotoxischen Wirkung des Äthers, der relativ langen Versuchsdauer und im Hinblick auf die nachfolgende histologische Untersuchung der Leber mußte eine tägliche Narkotisierung unterbleiben.

Auch sollten alle Tiere streng unter den gleichen Bedingungen hinsichtlich Ernährung, Stress und medikamentöser Belastung gehalten werden.

Die Verabreichung im Trinkwasser schien uns möglich, da KALLIKREIN in wässriger Lösung sehr stabil ist und einige Autoren bei ihren Versuchen auch bei oraler Zufuhr von KALLIKREIN eine Steigerung der DNS -Synthese in Knochenmarkszellen beziehungsweise basalen Zellen der Zunge gesehen hatten.

b) Lokale Applikation

Bei den Tieren mit lokaler Behandlung wurde KALIIKREIN beziehungsweise Kochsalzlösung mit feinen Watteträgern auf ein definiertes Areal innerhalb des rasierten Gebietes aufgetragen (siehe punktierte Fläche der Abbildung). Dieses Areal war 2 x 2 cm groß und lag vor dem sakralen Rand der rasierten Fläche.

c) Parenterale Applikation

Den Tieren der parenteralen Versuchsgruppe wurden die Substanzen intraperitoneal injiziert. Die Injektion von 1,5 bis 2 ml der isotonen Lösungen mit Einmalkanülen No.18 wurden nach wenigen Tagen weitgehend toleriert und gut vertragen. Wir konnten während des Versuchszeitraumes keine lokalen Infektionen der Bauchwand, oder auf peritoneale Reizungen zurückzuführende Erkrankungen beobachten, auch lieferte weder die makroskopische Betrachtung der Bauchdecken im Injektionsbereich und der Bauchorgane noch deren histologische Untersuchung einen Anhalt für vorhandene oder abgelaufene entzündliche Prozesse.

Die Konzentrationen der Kallikreinlösungen waren so gewählt, daß den Tieren nur sehr geringe Volumina zugemutet werden mußten. Bei Lösungen mit 200 KE/ml bzw. 40 KE/ml und einem Maximalgewicht von 350 Gramm bei Versuchsende bedeutete dies zur Erlangung der geforderten Mengen pro Gewichtseinheit:

oral.....3,5 ml

lokal.....0,35ml

parenteral.....1,75ml pro Tag und Tier.

3. Vorbereitung zur Untersuchung über das Haarwachstum

Bei sämtlichen Tieren wurde zu Versuchsbeginn in Äther-Narkose ein definiertes Fellareal auf dem Rücken rasiert (siehe Abbildung). Dies erstreckte sich vom Kreuzbein bis zur Grenze vom unteren zum mittleren Thoraxdrittel. Seitlich reichte es auf beiden Seiten etwa bis zur Hälfte der Leibeshöhe.



rasieretes
Areal



Areal m.
lok. Appl.



Areal d.
Hauptentnahme



4. Haarwachstumskontrolle

Während des gesamten Versuchszeitraumes von sechs Wochen wurden im Abstand von drei Tagen je fünf Haare aus dem rasierten Areal, einen Zentimeter vor dem sacralen Rand entnommen (siehe dicht schraffiertes Gebiet der Abb.) und nach Fixierung auf einer transparenten Klebefolie ausgemessen.

5. Versuchsende - Gewebsentnahme

Am 42. Tag nach Beginn der Versuche wurden die Tiere durch Luxationsfraktur des ersten oder zweiten Halswirbelkörpers mit Zerstörung des Rückenmarks getötet, Leber, Milz, Niere und Keimdrüsen entnommen und innerhalb von fünf Minuten nach Eintritt des Todes in 10 %ige Formalinlösung gebracht.

Die beschriebene Art der Tötung wurde gewählt, um eventuelle Veränderungen an inneren Organen durch hohe Dosen toxischer Substanzen und Stress zu vermeiden.

Die histologische Beurteilung der entnommenen Gewebe erfolgte in der Abteilung für klinische Pathologie der chirurgischen Universitätsklinik Erlangen, Leiter: Prof. Dr. Hermanek.

6. Histologische Technik

Von den entnommenen Organen - Leber, Milz Niere - wurde jeweils eine fünf Millimeter dicke Scheibe, der Hoden zur Gänze, in 10 %ige neutrale Formaldehydlösung gebracht.

Die Einbettung der fixierten Präparate erfolgte in Paraplast, dabei wurde der Hoden zur Gänze, von den anderen Organen je ein Block eingebettet.

Es wurde je ein Schnitt aus der Zone zwischen ersten und zweitem, beziehungsweise zweitem und dritten Drittel des Blockes entnommen.

Die Färbung erfolgte mit Haematoxylin - Eosin.

Da bei der orientierenden Untersuchung der HE-gefärbten Schnitte keine Veränderungen sichtbar wurden, wurde auf weitere Schnitte mit Spezialfärbungen verzichtet.

An je drei Stichproben aus der Gruppe der mit Kallikrein bzw. physiologischer Kochsalzlösung parenteral behandelten Tiere wurden an den Hoden morphometrische Untersuchungen durchgeführt. Es wurden dabei an je 30 tubuli der größte Durchmesser und die absolute Zahl der Keimzellen bestimmt.

IV Ergebnisse

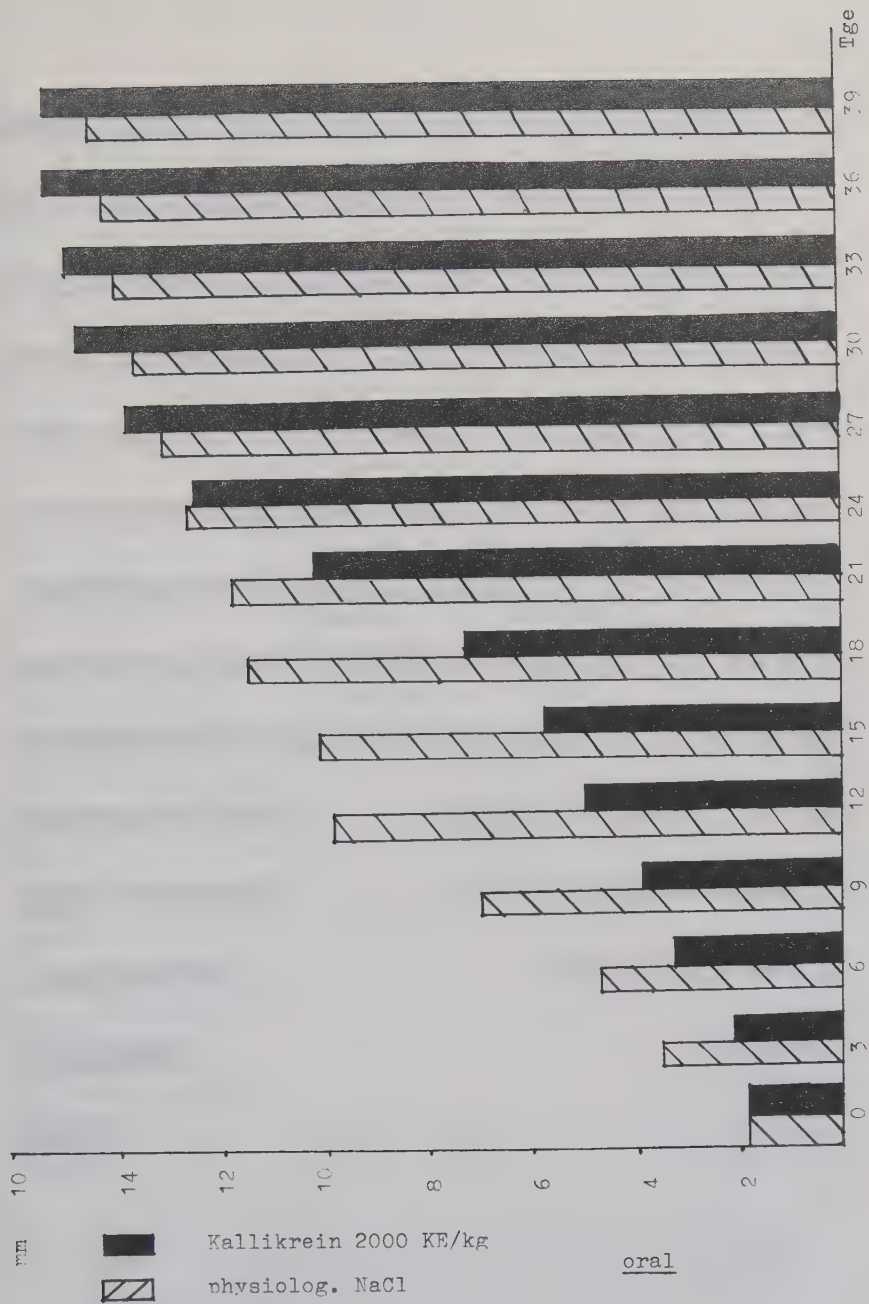
1. Haarwachstum

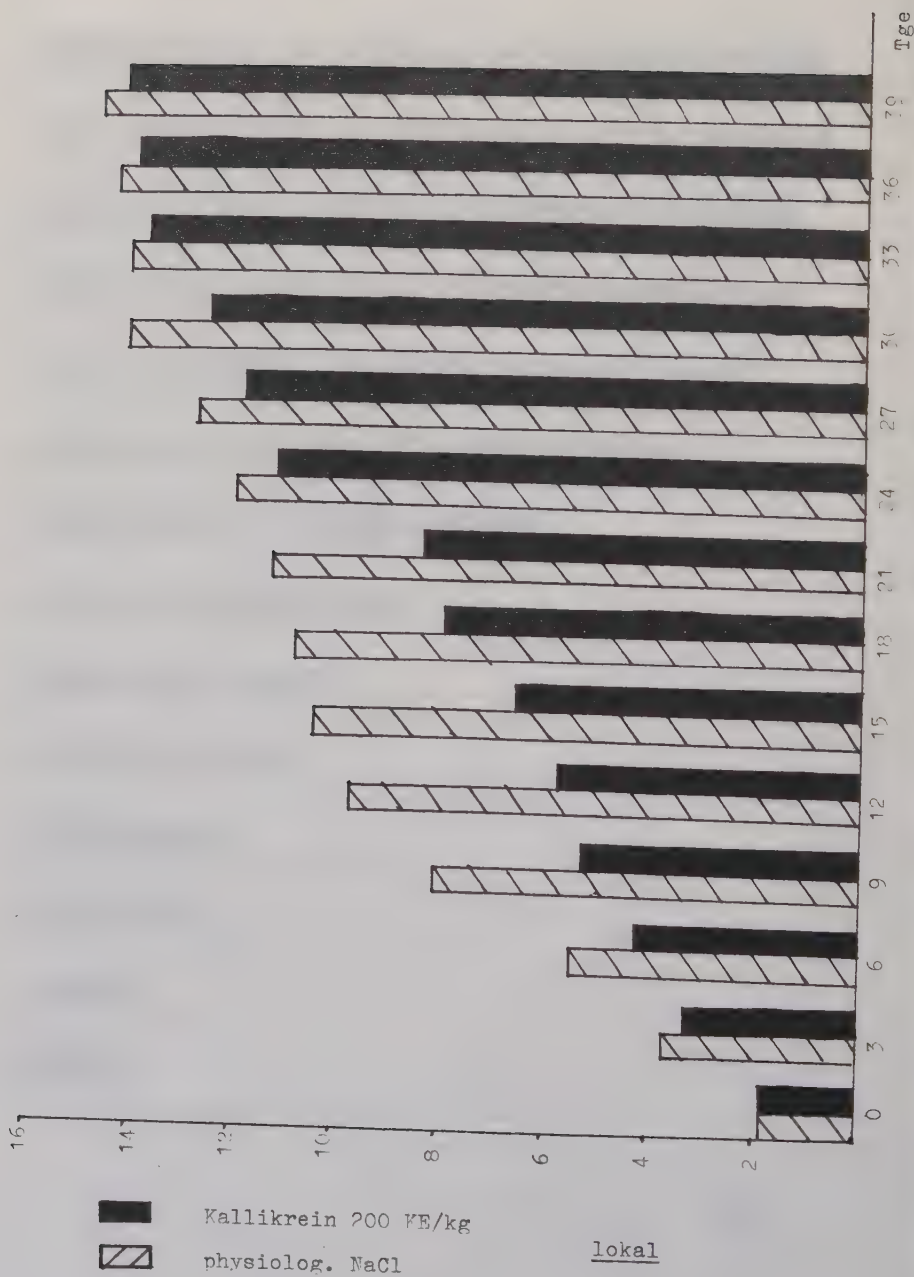
Wie die Tabellen 1 bis 3 mit Darstellung der Mittelwerte des Haarwachstums zeigen, erfolgt dies bei den Tieren der Gruppen mit oraler und lokaler Kallikreingabe besonders in der ersten Hälfte des Versuchszeitraumes deutlich langsamer als bei den Kontrolltieren, gleicht sich aber in der zweiten Hälfte dem der Tiere mit Kochsalzbehandlung weitgehend an. Bei der Gruppe mit parenteraler Kallikreingabe hingegen findet sich initial ein gering verstärktes Wachstum der Haare, das sich jedoch ebenfalls bald den Ergebnissen der Kontrollgruppe angleicht.

In den Tabellen 4 bis 6 wird das Gewicht der Tiere als Parameter für das Wachstum eingesetzt und mit dem Verlauf des Haarwachstums verglichen. Es zeigt sich bei oraler (Abb.4) und lokaler (Abb.5) Verabreichung sowohl von Kallikrein als auch von physiologischer Kochsalzlösung eine völlige Inkongruenz der Kurven. Lediglich für das Haarwachstum findet sich ein annähernd asymptotischer Verlauf, wie er für biologische Wachstumsvorgänge

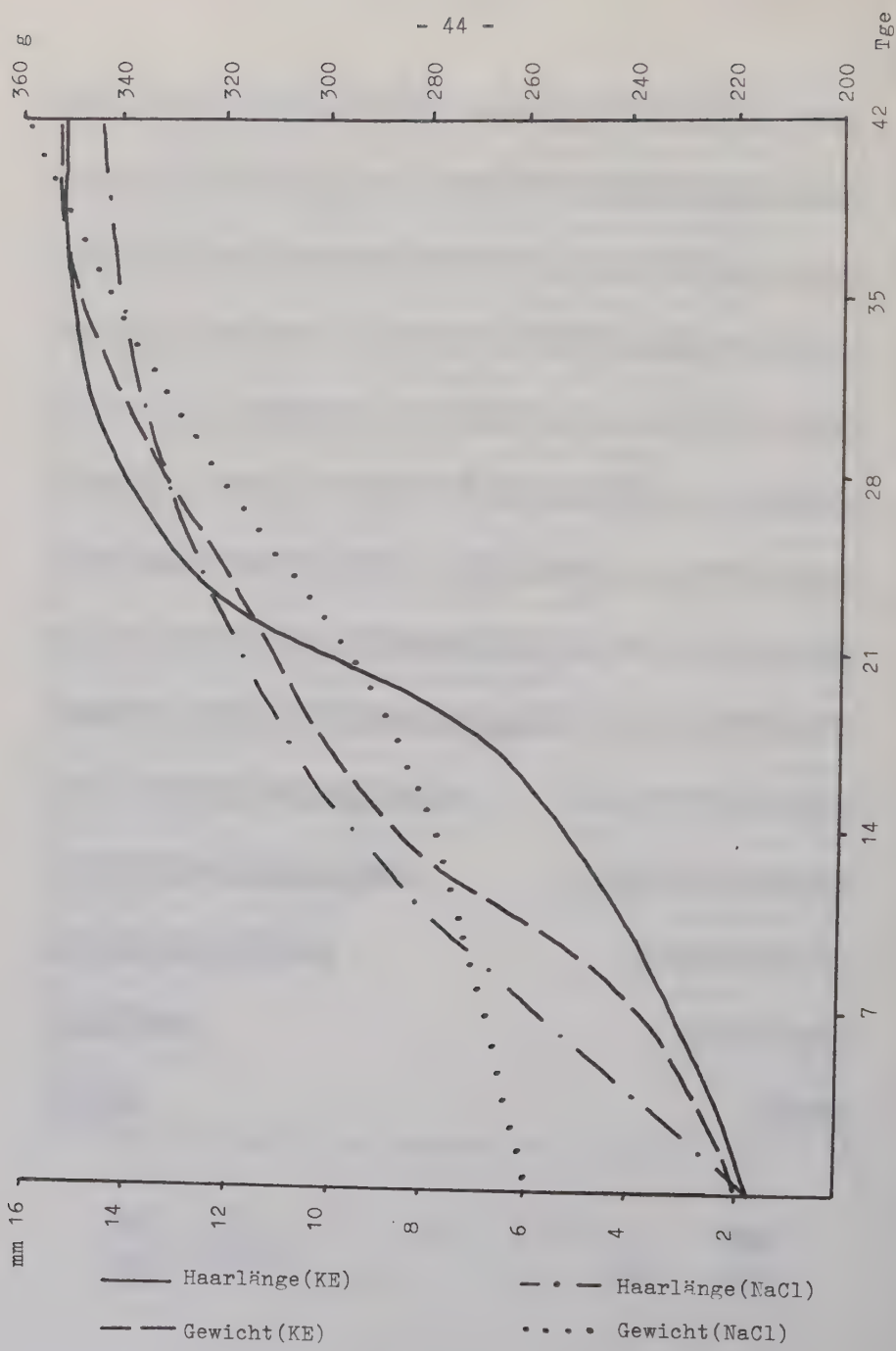
zu erwarten ist, während der Gewichtsanstieg schwankt. Die Endlänge der Haare liegt zwischen 14 und 16 mm und wird gegen Ende des sechswöchigen Beobachtungszeitraums erreicht.

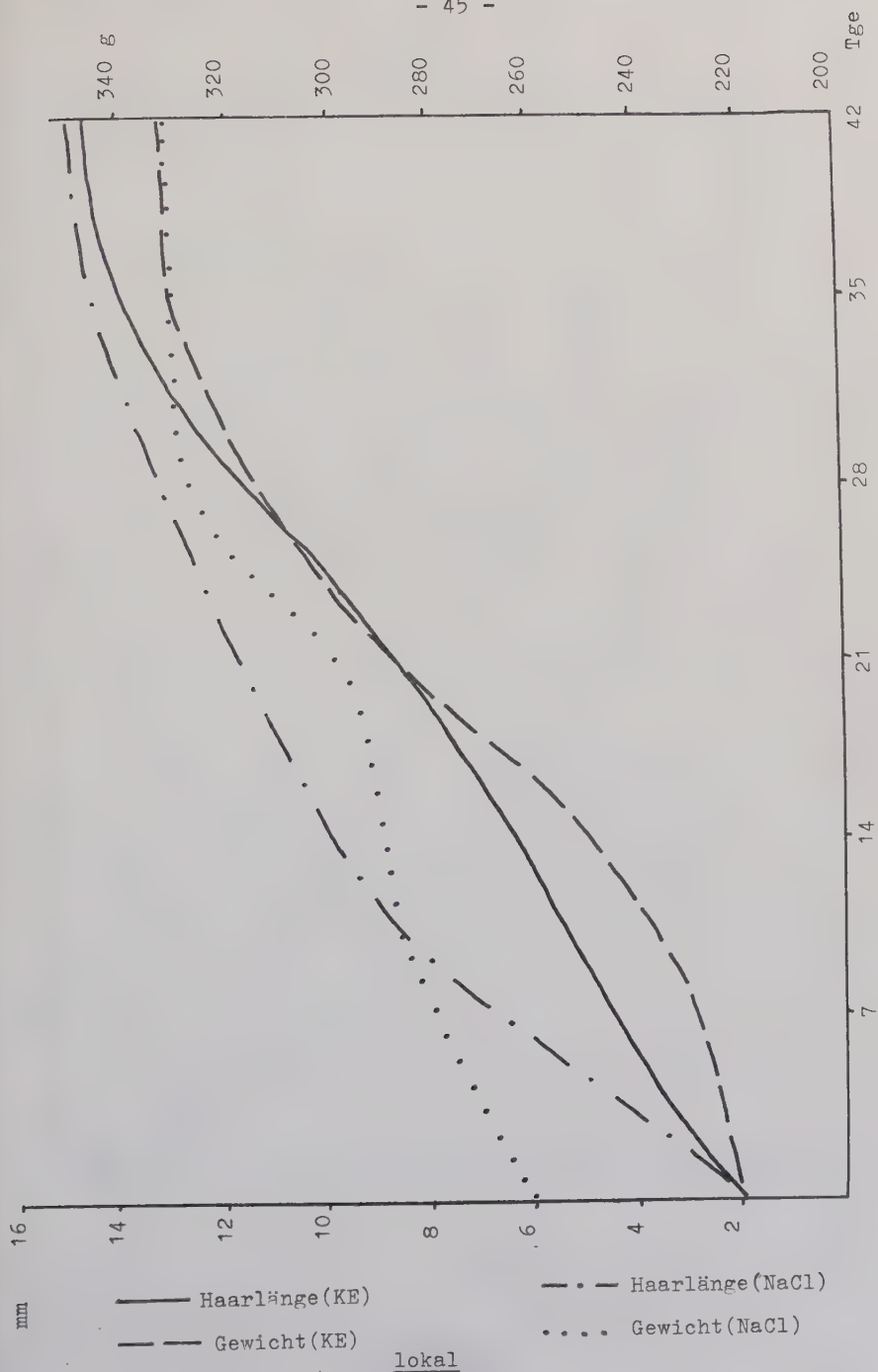
Bei den Gruppen mit parenteraler Applikation der Substanzen findet sich in beiden Fällen eine weitgehende Parallelität von Gewichts- und Haarlängenzunahme bei um 10 bzw. 20 Gramm niedrigerem Durchschnittsgewicht gegenüber den beiden Gruppen mit den anderen Verabreichungsformen.

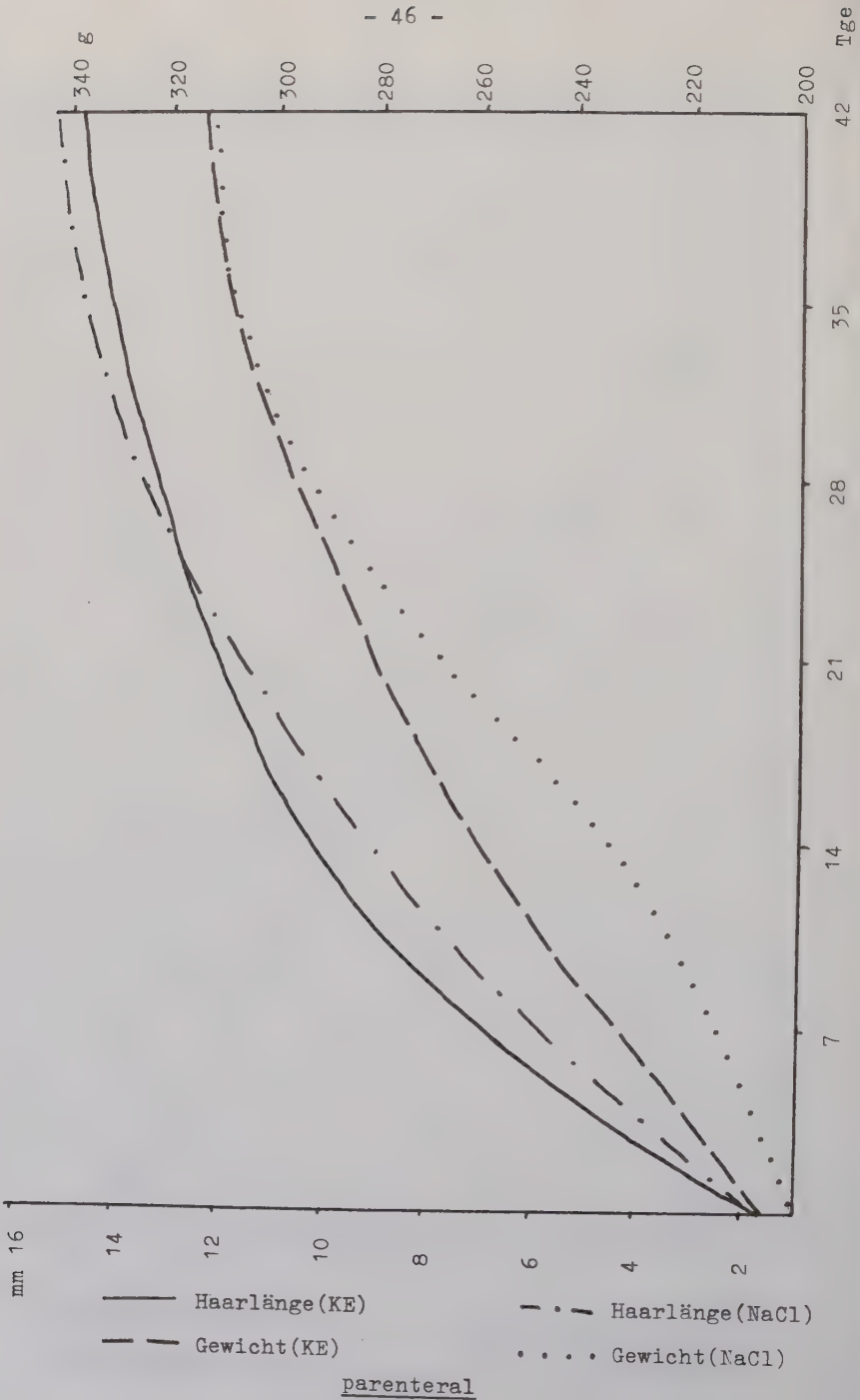












2. Innere Organe

a) Sektionsbefunde

Am Ende der Versuchszeit zeigte keines der Tiere Zeichen einer akuten Erkrankung. Sie waren lebhaft und hatten dichtes, glattes Fell.

Bei der Eröffnung des Abdomens fanden sich in der Bauchwand der parenteral mit Kallikrein oder Kochsalzlösung behandelten Tiere keine Zeichen von akuten oder abgelaufenen entzündlichen Prozessen.

Das Omentum majus zeigte mit Ausnahme zweier Fälle, in denen es bräunlich verfärbt war, reichlich Fett, ebenso die Mesenterien.

Die Serosa der Därme war in allen Fällen glatt und spiegelnd, die Därme selbst rosig und gegeneinander und gegen die Bauchwände frei beweglich. Die Leber war bei allen Tieren von dunkelbrauner Farbe und fester Konsistenz, die Oberfläche spiegelnd.

Die Milz war stets glatt, dunkelviolett und fest.

Die Nieren zeigten regelrechte, dunkelbraune Farbe und waren von reichlichen Fettkapseln umgeben.

Die Samenstränge wiesen massiven Fettbesatz auf.

Die probeweise Eröffnung der Thoraxhöhle ergab bei allen Tieren rosige Lungen mit spiegelnder Oberfläche ohne Pleuraverwachsungen. Die Herzen zeigten braunrote Farbe, glattes Epicard und keinerlei Fettbesatz.

b) Histologie

1. Leber

Bei insgesamt sechs der 120 Versuchstiere fanden sich Veränderungen an der Leber.

Es handelte sich um folgende Tiere:

1. Nr.19, NaCl oral: leichte cholangitische

Leberfibrose

2. Nr.21, NaCl oral: passive Hyperämie der

Leber mit erweiterten

blutgefüllten Sinus-

und Lebervenen

3. Nr.77, KE, oral:

geringe portale Rund-

4. Nr.85 KE, lokal:

zellinfiltration ohne

5. Nr.94 KE, lokal:

degenerative od. ent-

6. Nr.117 KE, parenteral:

zündliche Veränderungen

an den Leberzellen

Bei den anderen Präparaten konnten an Leber-
epithelien, Sternzellen, sinuportalem Bindegewebe, Gefäßen oder Gallenwegen keine Veränderungen festgestellt werden.

2. Milz

Bei allen untersuchten Tieren fanden sich regel-

rechte Verhältnisse. Insbesondere zeigten sich keine Veränderungen in Zahl und Größe der Follikel.

3. Niere

Die Nieren sämtlicher Tiere zeigten normale unauffällige Verhältnisse. Weder am glomerulären Apparat noch an den Tubulusepithelien noch am Interstitium fanden sich pathologische Befunde.

4. Hoden

Auch bei der histologischen Untersuchung der Hoden zeigte sich in allen Fällen ein gleichmäßiges geordnetes Bild. Unterschiede in den Durchmessern oder dem Zellgehalt der Tubuli waren nicht feststellbar. Die morphometrischen Untersuchungen von Stichproben aus der Gruppe der mit Kallikrein parenteral behandelten Tiere sowie der betreffenden Kontrollen erbrachten keine fassbaren Unterschiede.

Milz, Niere und Hoden boten bei allen Tieren

weder pathologische noch unterschiedliche histologische Befunde. Bei den durch die Äthernarkose zu Beginn der Versuche möglicherweise vorgeschädigten Lebern fanden sich bei einem Tier die Zeichen einer leichten cholangitischen Fibrose, bei einem weiteren Tier eine passive Hyperämie und bei insgesamt vier weiteren Fällen aus Kollektiven mit unterschiedlicher Verabreichungsform von Kalikrein eine geringe portale Rundzellinfiltration.

V Diskussion

1. Haarwachstum

Wie bei der Darstellung der Ergebnisse gezeigt findet sich bei oraler und lokaler Kallikrein-gabe anfangs, im Vergleich zu den Kontrollgruppen verzögertes Haarwachstum.

Worauf dieser verminderte Zuwachs zurückzuführen ist, ist nicht ohne weiteres zu erklären, da gerade bei diesen Tieren der Eingriff in den Lebenslauf doch geringer war als bei den Versuchsgruppen mit parenteraler Verabreichung. Setzt man das Gewicht als Parameter für das allgemeine Wachstum der Tiere und vergleicht diese Kurven mit den Haarlängen bei den einzelnen Gruppen, so ist die allgemeine körperliche Entwicklung als beeinflussender Faktor auszuschließen.

Mit größter Wahrscheinlichkeit ist die Tatsache, daß aus organisatorischen Gründen die Versuchsgruppe mit Kallikreinbehandlung im Dezember, die Vergleichskollektive jedoch im Juni untersucht wurden, als Ursache für die Divergenz im Anfangsstadium der Kallikrein- bzw. Kochsalzgabe anzusehen.

2. Organbefunde

Bei der Betrachtung der histologischen Leberbefunde fällt auf, daß sich die portale Rundzellinfiltration, die sich bei vier Tieren findet und damit die Hauptmasse der histologischen Veränderungen ausmacht, nur bei Tieren mit Kallikreinbehandlung auftrat.

Bei Berücksichtigung der Verabreichungsformen kann jedoch eine spezifische Wirkung von Kallikrein weitgehend ausgeschlossen werden, denn die Veränderungen finden sich bei zwei Tieren mit lokaler Kallikreinbehandlung und nur bei je einem Tier mit oraler und parenteraler Applikation. Sollte es sich um einen kallikrein-spezifischen Prozess handeln, so müßte man eine praktisch vollständige Resorption der auf die Haut aufgetragenen Kallikreindosis, die wie bei parenteraler Verabreichung 200 KE/kg betrug, annehmen. Da dies bei einer wässrigen Lösung ohne besondere Zusätze zur Permeabilitätssteigerung der Haut als unwahrscheinlich betrachtet werden kann, muß ein anderer Faktor als Ursache für die pathologischen Befunde angeschuldigt werden. Dieser könnte, wie bei den geringen Verschiebungen

des Haarwachstums, in der Tatsache der großen zeitlichen Verschiebung zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen zu suchen sein. Es erscheint uns nicht unmöglich, daß bei einem Teil der Tiere der mit Kallikrein behandelten Gruppen eine Infektionskrankheit ohne auffällige klinische Symptome abgelaufen sein könnte.

Wegen dieser Tatsache und des zahlenmäßig geringen und über alle Gruppen verstreuten Auftretens der pathologischen Befunde lassen unsere Untersuchungen doch den Schluß zu, daß Kallikrein in der von uns verwendeten Dosierung über einen Zeitraum von sechs Wochen, unabhängig von der Verabreichungsform keine spezifischen Veränderungen an inneren Organen hervorruft.

Die von G. Stüttgen beobachteten Veränderungen von Zahl und Qualität der Spermien konnte bei der histologischen Untersuchung der Hoden von uns nicht bestätigt werden.

Literaturverzeichnis

ARENS, A., G. L. HABERLAND: Determination of KALLIKREIN Activity in Animal Tissue Using Biochemical Methods. Symposium: KALLIKREIN - Physiological Properties and Pharmacological Rational, Mainz Nov. 1972

BEILENSEN, S., M. SCHACHTER, L. H. SMAYE: Secretion of KALLIKREIN and its Role in Vasodilatation in the Submaxillary Gland. J. Physiol. 199:303 (1968)

BHOOLA, K. D.: The Subcellular Distribution of Pancreatic KALLIKREIN. Biochem. Pharmacol. 18:2279 (1969)

BHOOLA, K. D., G. DOREY: KALLIKREIN, Trypsin-like Proteases and Amylase in Mammalian Submaxillary Glands. Brit. J. Pharmacol. 43:784 (1971)

BISSET, G. W., G. P. LEWIS: Brit. J. Pharmacol. 19:168 (1962)

BUDDEKE, E.: Lehrbuch der Biochemie. DeGruyter (1971)

CASPARY, W. F., W. CREUTZFELDT: The Influence of KALLIKREIN on Absorption of Sugars and Amino Acids in Rat Small Intestine in Vitro. Symposium KALLIKREIN - Physiological Properties and Pharmacological Rational Mainz Nov 1972

· DE CARVALHO, I.F.: Studies on the Kinin-forming Enzyme (Kininogen) of Rat Kidney. In: Kidney Hormones. Ed. by J.W. FISCHER. Acad. Press Inc., London-New York (1971)

DENNHARDT, R., J.F. HABERICH: Effect of KALLIKREIN on the Absorption of Water, Electrolytes and Hexoses in the Intestine of Rats. Symposium KALLIKREIN - Physiological Properties and Pharmacological Rational Mainz Nov. 1972

ERDÖS, E.G., Hrsgeb.: Handbook of Experimental Pharmacology: Bradykinin, Kallidin and KALLIKREIN. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1970)

FIEDLER, F., B. MÜLLER, E. WERLE: FEBS Letters 24:41 (1972)

FIEDLER, F., B. MÜLLER, E. WERLE: Aminosäuresequenz im Bereich des Serins im aktiven Zentrum des KALLIKREINS aus Schweinepancreas. Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 352:1463 (1971)

FREY, E.K., H. KRAUT: Ein neues Kreislaufhormon und seine Wirkung. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharm. 133:1 (1928)

FREY, E.K., H.KRAUT, E.WERLE, R.VOGEL, I.TRAUTSCHOLD
u.G.ZICKGRAF: Das KALIIKREIN-Kinin-System und seine
Inhibitoren. F.Enke Verlag Stuttgart (1968)

FREY, E.K., H.WERLE: KALIIKREIN - Padutin.
F.Enke Verlag Stuttgart (1950)

FURUYAMA, T., C.SUZUKY: Tokohu J.exper.Med. 89:69 (1966)

HABERMANN, E.: Trennung und Reinigung von Pancreas-
KALLIKREINen. Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 328:15 (1962)

HILTON, S.M., G.P.LEWIS: The Mechanism of the Functional
Hyperaemia in the Submandibular Salivary Gland.
J.Physiol. 129:253 (1955)

HILTON, S.M.: Further Experiments on the Role of Human
Plasma Kinins as Mediators of Functional Vasodilatation
in Glandular Tissues. In: Hypotensive Peptides.
Eds. E.G.EPDÖS, N.BACK, F.SICUTERI. Springer Verlag,
New York (1966)

KRAUT, H., E.K.FREY, E.BAUER: Über ein neues Kreislauf-
hormon, 2. Mitteilung. Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem.
175:97 (1928)

KRAUT, H., E. K. FREY, E. WERLE: Der Nachweis eines Kreislaufhormons in der Pankreasdrüse. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 189:97 (1930)

KRAUT, H., E. K. FREY, E. WERLE: Über den Nachweis und das Vorkommen des KALLIKREINS im Blut. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 222:73 (1933)

KUTZBACH, C., G. SCHMIDT-KASTNER: Properties of Highly Purified KALLIKREIN. Symposium: KALLIKREIN - Physiological Properties and Pharmacological Rational. Mainz Nov. 1972

LANDSLEITNER, B., J. GELDMACHER, H. FEUSTFL, F. ITTNER: Einfluß von KALLIKREIN auf die Bindegewebsproliferation im Tierversuch. Die Medizinische Welt 43 (1974)

LUDANY, G., J. VAJDA, J. BERTHA: Naturwissenschaften 54:51 (1967)

MARGOLIS, J.: Initiation of Blood Coagulation by Glass and Related Surfaces. J. Physiol. 137:95 (1957)

MARGOLIS, J.: The Mode of Action of Hageman Factor in the Release of Plasma Kinin. J. Physiol. 151:238 (1960)

MASHFORD, M.L., M.L. ROBERTS: Radioimmunoassay of
Circulating Blood Kinin Levels. *Advanc. exp. Med.*
21:31 (1972)

MASSART, A., J. HENRY: *J. Belg. Radiol.* 44:667 (1961)

MASSART, A., J. RODESCH: *Rapp. EUR* 125 (1962)

MENG, G., G.L. HABERLAND: Influence of KALLIKREIN on
Glucose Transport in the Isolated Rat Intestine.
Symposium: KALLIKREIN - Physiological Properties
and Pharmacological Rational. Mainz Nov. 1972

MORIWAKI, C., N. INOUE, Y. HOJIMA, H. MORIYA: A New Assay
Method for the Esterolytic Activity of KALLIKREINS
with Chromotropic Acid. *Yakugaku zasshi (J. Pharmaceut.*
Soc Japan) 91:413 (1971)

RIXON, R.H., J.F. WHITFIELD, J. BAYLISS: The Stimulation
of Mitotic Activity in the Thymus and Bone Marrow
of Rats by KALLIKREIN. *Horm. Metabol. Res.* 3:279-284 (1971)

RIYON, R.H., J.F. WHITFIELD: KALLIKREIN, Kinin and
Cell Proliferation. Symposium: KALLIKREIN - Physiological
Properties and Pharmacological Rational.
Mainz Nov. 1972

ROCHIA e SILVA,M.L.,L.REIS,L.OKINO:Comperative
Actions of Increasing Molecular Weight on Smooth
Muscle,Blood Pressure and Vascular Permeability.
Advanc.exp.Med.Biol.21:309(1972)

ROHEN,J.W.,I.PETERHOFF:Stimulation of Mitotic
Activity by KALIIKREIN in the Gastrointestinal
Tract of Rats.Symposium:KALIIKREIN - Physiological
Properties and Pharmacological Rational.Mainz Nov 1972

SCHACHTER,M.:KALIIKREIN and Vasodilatation in the
Salivary Gland.In:Hypotensive Peptides.Eds.E.G.ERDÖS,
N.BACK,F.SICUTERI.Springer Verlag New York (1966)

SCHNEIDER,D.,P.W.SPRINGORUM:Arch.klin.Chir.
194:373(1939)

STÜRMER,E.:The Influence of Intra-arterial Infusions
of Synthetic Bradykinin on Flow and Composition of
Lymph in Dogs.In:ERDÖS,E.G.,N.BACK,F.SICUTERI,
A.F.WILDE:Hypotensive Peptides.Springer Verlag
New York 1966

STÜRMER,E.,P.BERDE:Arch exper.Pathol.Pharmacol.
243:355(1962)

STÜRMER, E., B. FERDE: J. Pharmacol. exp. Therap.

139:38(1963)

TRAUTSCHOLD, I., E. WERLE: In: Methoden der enzymatischen Analyse. Ed. H. U. BERGMAYER. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1962

WERLE, E., P. v. RODEN: Über das Vorkommen des KALLIKREINS in den Speicheldrüsen und im Mundspeichel.

Biochem. Z. 286:213(1936)

WERLE, E.: Über KALLIKREIN aus Blut. 3. Mitteilung.

Biochem. Z. 287:235(1936)

WERLE, E., F. FIEDLER, H. FRITZ: Recent Studies on KALLIKREINS and KALLIKREIN Inhibitors.

Vth. Int. Congr. Pharmacol., San Francisco Jul. 1972

WERLE, E.: Entwicklungslinien und Ergebnisse der KALLIKREIN-Kininforschung. Münch. Med. Wschr.

115:225(1973)

WITTE, S., K. T. SCHRICKER, E. SCHMID: Arzneimittel Forsch.

11:619(1962)

ZWEIFACH, B. W., E. G. ERDÖS, N. BACK, F. SICUTERI:

Hypotensive Peptides. Springer Verlag, New York 1966

Lebenslauf

Am 17. Juli 1951 wurde ich, Friedrich Lothar Kern als Sohn des Verwaltungsangestellten Rudolf Kern und dessen Ehefrau Elfriede, geb. Cöster in Wiedersbach, Landkreis Ansbach geboren.

In Wiedersbach besuchte ich von 1957 bis 1961 die Volksschule. Im September 1961 trat ich in das mathematisch naturwissenschaftliche Platen-Gymnasium in Ansbach über, wo ich im Juni 1970 die Reifeprüfung ablegte.

Von Juni 1970 bis zu meiner Zulassung zum Studium der Medizin an der Friedrich Alexander Universität Erlangen im April 1971 arbeitete ich zunächst als Praktikant, dann als Krankenhaushelfer am Stadt- und Kreiskrankenhaus Ansbach.

Im März 1972 legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung und im April 1973 die ärztliche Vorprüfung an der Friedrich Alexander Universität Erlangen ab.

Am 15. Januar 1976 habe ich mich bei der Universität Erlangen zum Staatsexamen gemeldet und dieses am 31. Juli 1976 erfolgreich abgeschlossen.

Am 10. August 1976 heiratete ich die Studentin der Philologie Angelika Bauer.

Erlangen, im September 1976

Friedrich Lothar Kern

Friedrich Lothar K e r n

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr.med.J.Geldmacher meinen Dank aussprechen für die freundliche Überlassung des Themas zu dieser Arbeit.

Auch sei Herrn Dr.med.B.Landsleitner für die Hilfestellung gedankt, die er mir bei den langwierigen Tierversuchen sowie bei der Abfassung des Manuskriptes leistete.

Nicht zuletzt sei auch Herrn Professor Dr.med. Hermanek für die Durchsicht der histologischen Präparate, sowie den BAYER -Werken und hier besonders Herrn Dr.med.P.Huber von der Abteilung medizinische Forschung in Elberfeld für die Überlassung des erforderlichen KALLIKREINS der Dank ausgesprochen.

Erlangen im September 1976

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197